



# 肝臓への取り組み～ラットを用いた肝障害の抑制評価～

きっかけとなった試験：プロバイオティクスおよび各種免疫賦活物質の効果に関する研究

(2005 麻布大学)

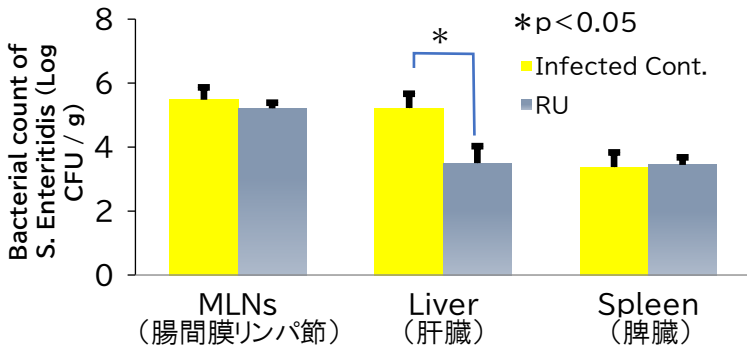
## 試験方法と結果

RUを10日間経口給与したラットをサルモネラ菌に感染させ5日後に剖検



肝臓にてサルモネラ菌数の減少を確認

(臓器侵入サルモネラ菌数)



試験結果から改めて肝臓への効果を確認すべく以下の試験を実施

## Rhizopus oryzae水抽出物の肝障害抑制効果の検討

(国際バイオEXPO発表)  
(2011 日本獣医学会発表)

### 試験方法

試験区を二つ設けてそれぞれRUを10日間毎日10mg/kg、100mg/kg給与し、10日目に薬剤で肝障害を引き起こさせた。その後の6, 12, 24, 48時間後に血液、肝臓をそれぞれ採材した。

試験区① n = 5  
RU:10 mg/kg /B.W /day

試験区② n = 6  
RU:100 mg/kg/B.W/day

対照区 n = 5

Wistarラット(4週齢、雄)

1日 2日 ... 10日

肝障害

CCL<sub>4</sub>経口投与  
(0.5 ml CCL<sub>4</sub>/kg/B.W)

6,12,24,48h

採材

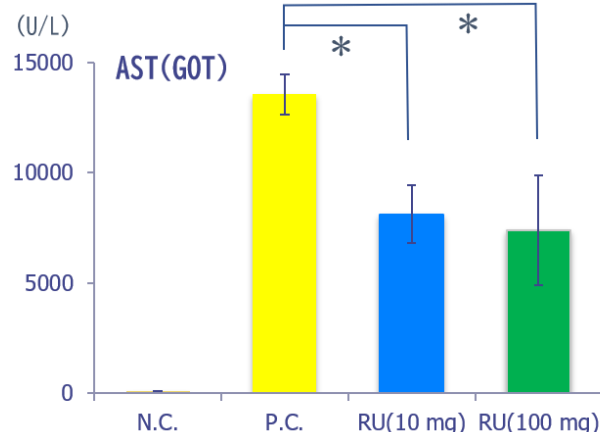
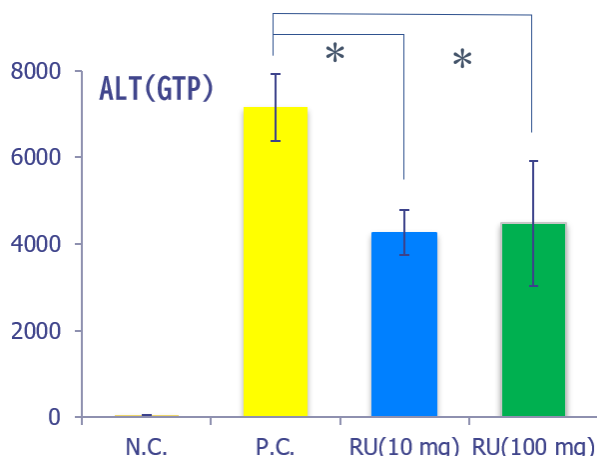
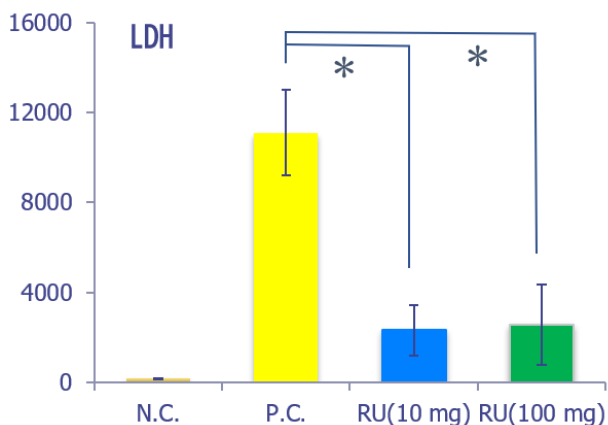
・血液  
・肝臓

### 結果 血液中の酵素

【48時間後】 (U/L)

血液中のLDH、AST(GOT)、ALT(GTP)を測定。肝臓にダメージを負うとこれらの酵素は血液に流出するため数値がダメージの大きさと比例する。

3種類全ての酵素の値において、両試験区共に対照区よりも低い数値を確認した。

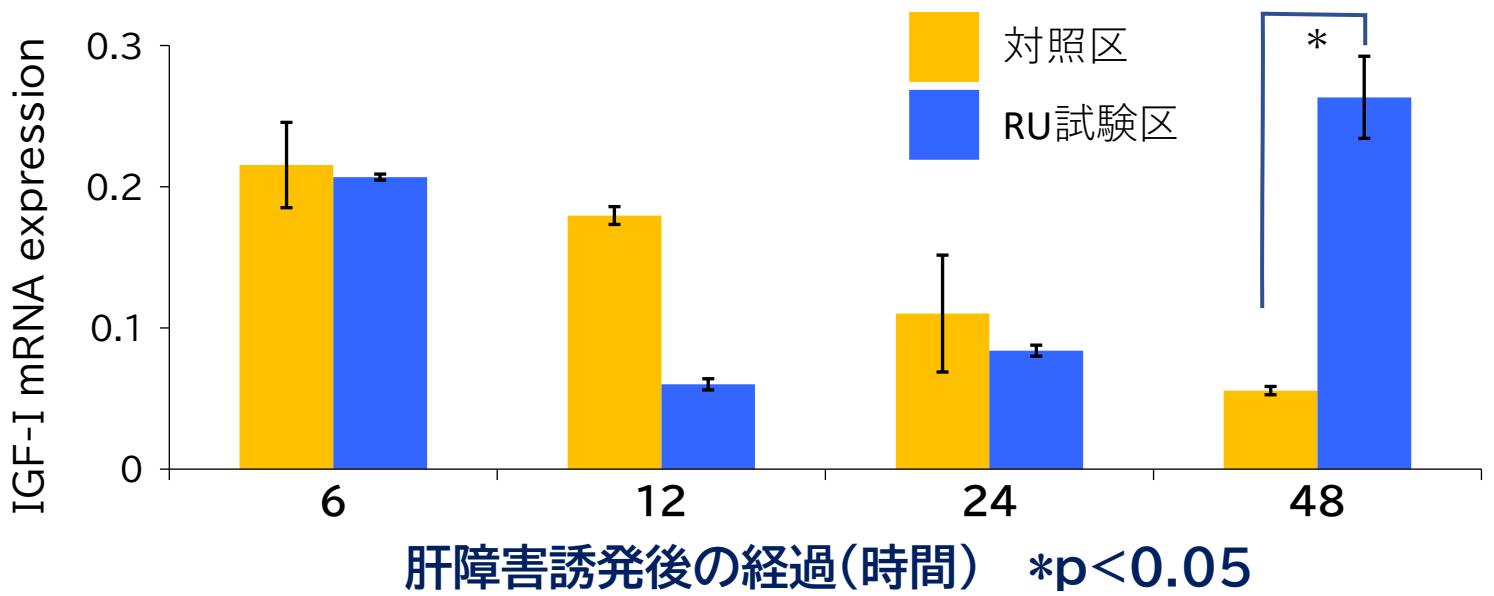




# 肝臓への取り組み～ラットを用いた肝障害の抑制評価～

## 結果 IGF-1遺伝子発現

肝障害誘発後のIGF-1遺伝子発現を比較したところ、48時間後には試験区で有意に上昇した。



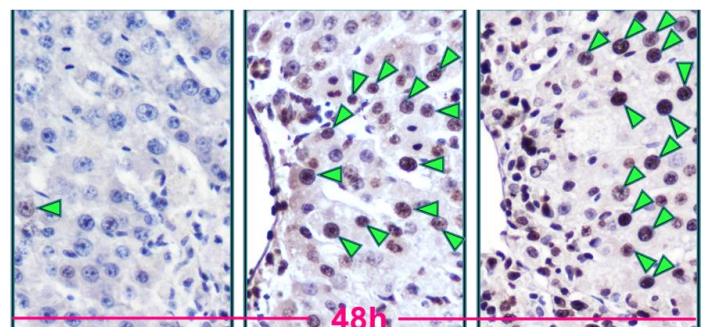
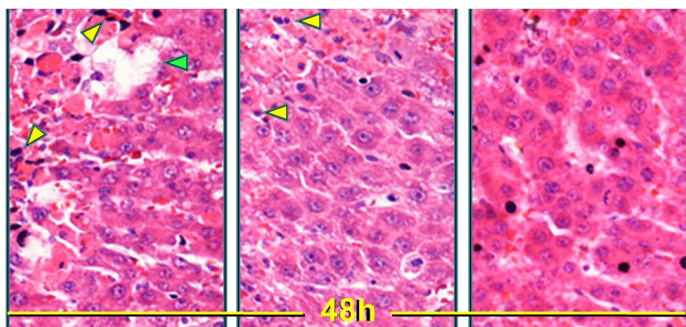
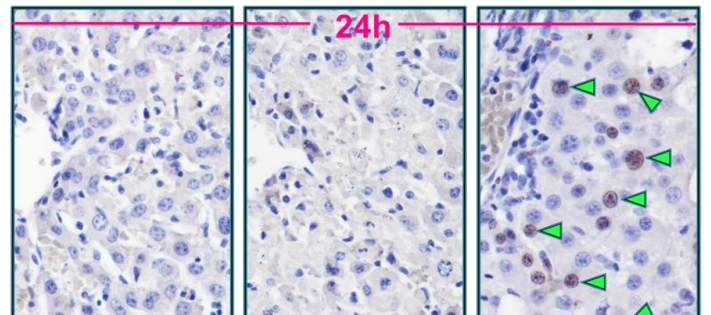
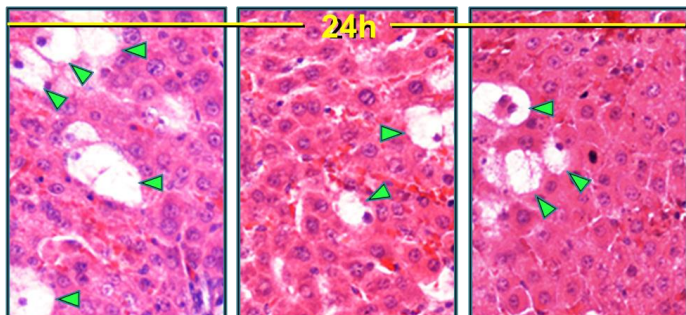
## 結果 肝細胞の状態

肝障害誘発後の肝細胞の写真と比較、緑の三角矢印が付いている白色部分は細胞が壊死し脂肪に変性したものの。

試験区は48時間後には試験区①②共に白色の脂肪変性部分が無くなっていることが確認された。

肝障害誘発後の肝細胞の写真と比較、緑の三角矢印が付いている黒点は細胞分裂を行う際に取り込まれる物質を黒く染色したものの。

24時間後にRU試験区②で染色が確認され、48時間後には試験区①②共に確認された。このことから試験区は対照区よりも早期に細胞分裂が行われ回復が促進されたと推察している。





# 肝臓への取り組み～牛を用いた肝障害の抑制評価～

予備試験: 乾乳後期の製品給与による成績評価

(2005 麻布大学)

試験方法と結果

空胎日数

石川県の酪農家4軒に協力いただき乾乳期の乳牛に1日10gヘパエイドを給与



全ての牧場で空胎日数が減少  
平均57日±22日減少 ( $p < 0.05$ )

	給与前	→	給与後	試験頭数
A牧場	153.7日	→	99.6日	n=25
B牧場	155.4日	→	106.8日	n=27
C牧場	173.8日	→	84.8日	n=9
D牧場	202.2日	→	164.7日	n=135

予備試験の結果を基に以下の試験を実施

## Rhizopus oryzae 水抽出物給与によるウシ血中IGF-1濃度の変化と繁殖成績に与える影響

(2013 日本獣医学会発表)

試験方法

試験区(ホルスタイン種経産)にヘパエイドを分娩20日前から毎日10gをトップドレスにて給与し、IGF-1及びP4の検査と血液生化学検査をそれぞれ以下の条件にて測定した。

試験区 n = 8  
ヘパエイド 10g/頭/日

分娩20日前～当日までトップドレス給与

IGF-1: 分娩日より1週間ごとに採血・測定

分娩20日前・・・1週前

分娩当日

1週後

2週

3週

4週

・・・8週

対照区 n = 8

ホルスタイン種(経産)

血液生化学検査: 分娩1週間前、分娩日および偶数週に測定

結果 繁殖成績と血液数値

RUを給与した試験区は分娩後発情までの日数、受胎率にて有意な結果を示した。

また分娩前後の血漿中NEFA濃度は試験区の方が低く、分娩後の血漿中のIGF-1濃度については試験区の方が高く、どちらも試験区にて優れた結果を確認した。

試験区

対照区

分娩後初回発情  
までの日数

43.0±33.1日  
(n=6)

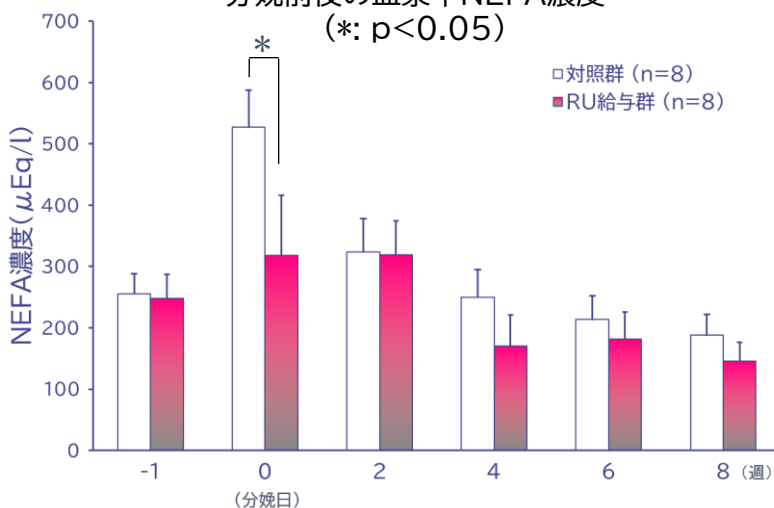
63.0±35.0日  
(n=5)

受胎率

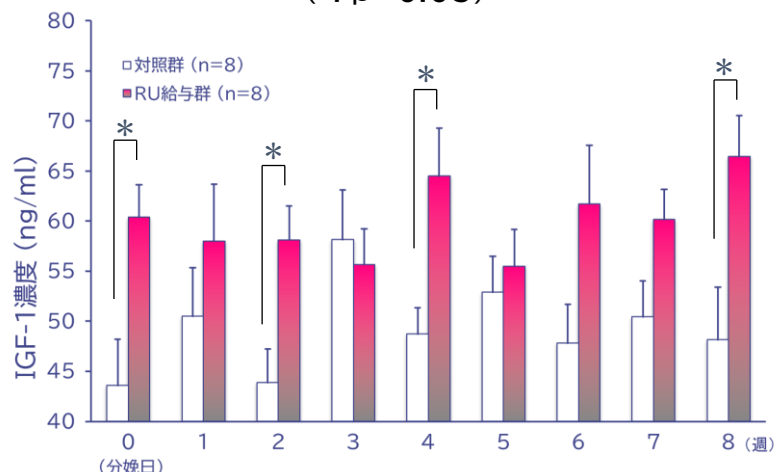
66.7%  
(6頭中4頭)

40%  
(5頭中2頭)

分娩前後の血漿中NEFA濃度  
(\*:  $p < 0.05$ )



分娩後の血漿中IGF-1濃度  
(\*:  $p < 0.05$ )





# 肝臓への取り組み～牛を用いた肝障害の抑制評価～

## Rhizopus oryzae 水抽出物給与が産褥期における乳牛の血清中肝障害マーカー及び肝組織中の機能関連遺伝子発現の動態に及ぼす影響

(2020 家畜感染症学会誌)

### 試験方法

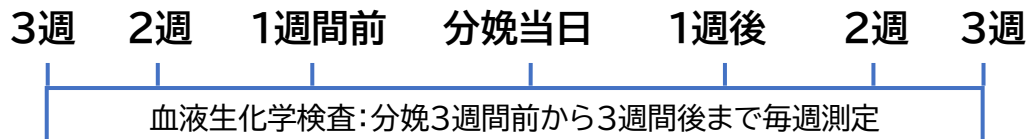
試験区(ホルスタイン種)にヘパイドを分娩3週間前から毎日10gを給与しつつ血液生化学検査を分娩3週間前から分娩3週間後まで毎週行い、血液中のAST、ALTを測定した。

試験区 n = 3  
ヘパイド 10g/頭/日

分娩3週間前～当日までヘパイドを給与

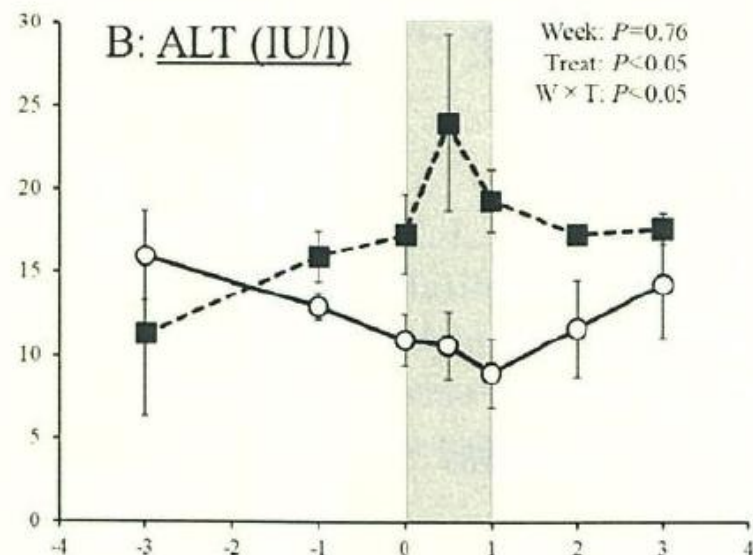
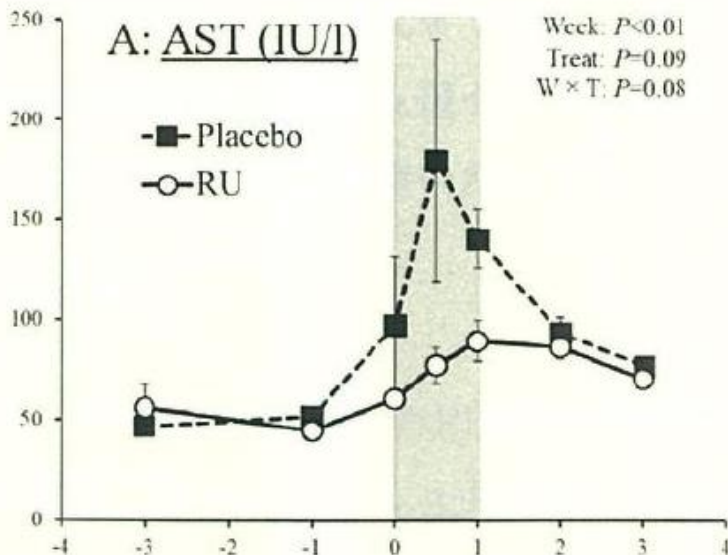
対照区 n = 3

ホルスタイン種



### 結果 血液生化学検査による血中の酵素

ヘパイドを給与した試験区はALT、AST共に対照区に比べて分娩前後の数値が低く、これら酵素が肝臓から流出した量が対照区に比べて少ないことが確認された。





# ~Evaluation of restraint for hepatopathy by rat~

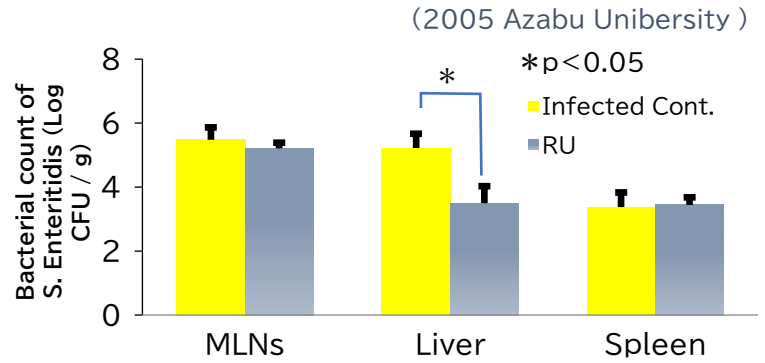
A test become start: Research on the effects of probiotics and various immunostimulants

## Test Methods and Results

Rats fed RU orally for 10 days were infected with Salmonella and autopsied 5 days later.



Reduction of Salmonella counts in liver was confirmed



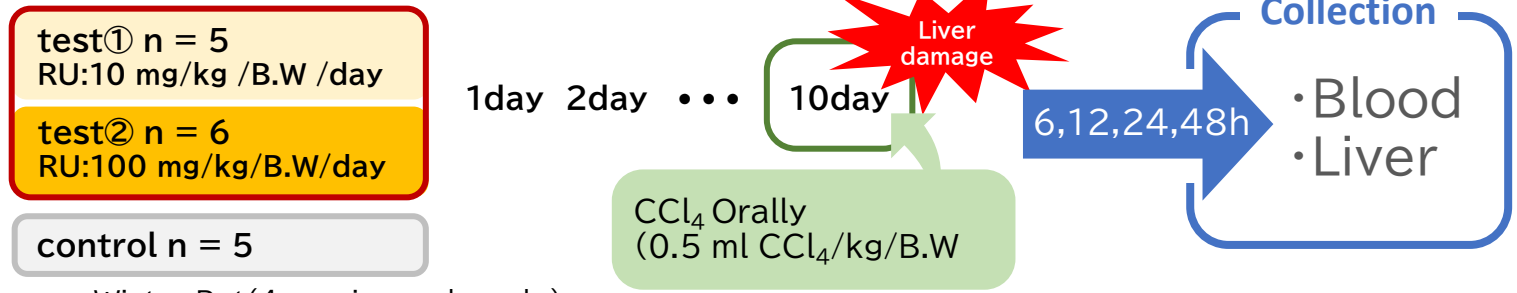
We carried out a test to clarify an effect of RU to liver to base of above result

## Investigation of the inhibitory effect of aqueous extract of Rhizopus oryzae on liver damage

(International Bio Expo)  
(2011 Japanese Society of Veterinary Science)

### Test method

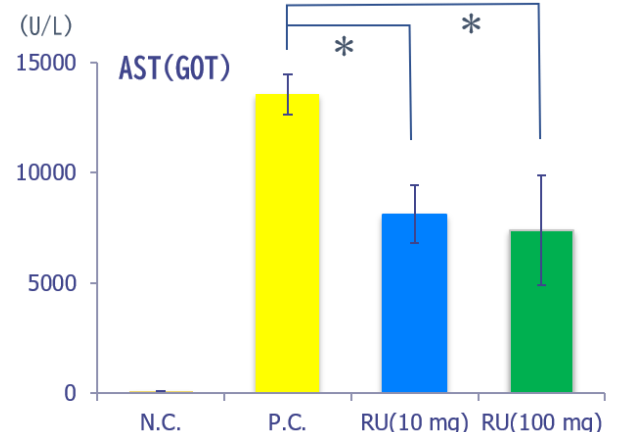
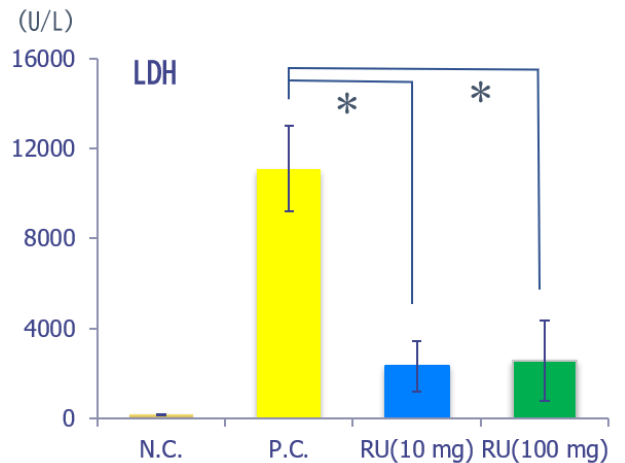
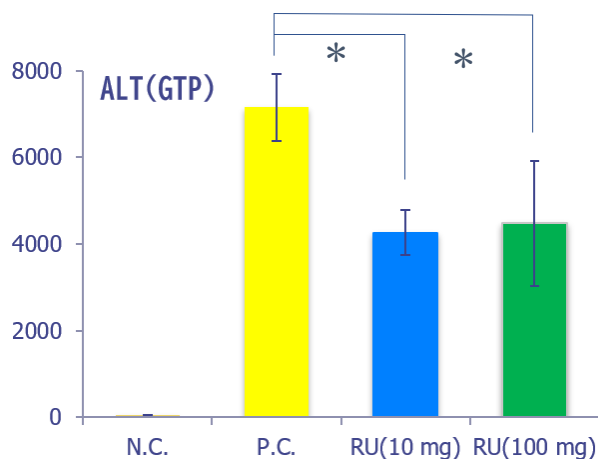
Two test areas were set up and fed 10 mg/kg and 100 mg/kg of RU daily for 10 days, respectively, and on the 10th day, liver damage was induced by the drug. Blood and liver samples were taken at 6, 12, 24, and 48 hours afterwards.



Wistar Rat(4 age in week, male)

### Result : Enzymes in blood [48hours later]

LDH、AST(GOT)、ALT(GTP) in blood were measured. These enzymes are leaked from liver to blood by damage. It was confirmed that values of both of test area were lower than that of the control area.

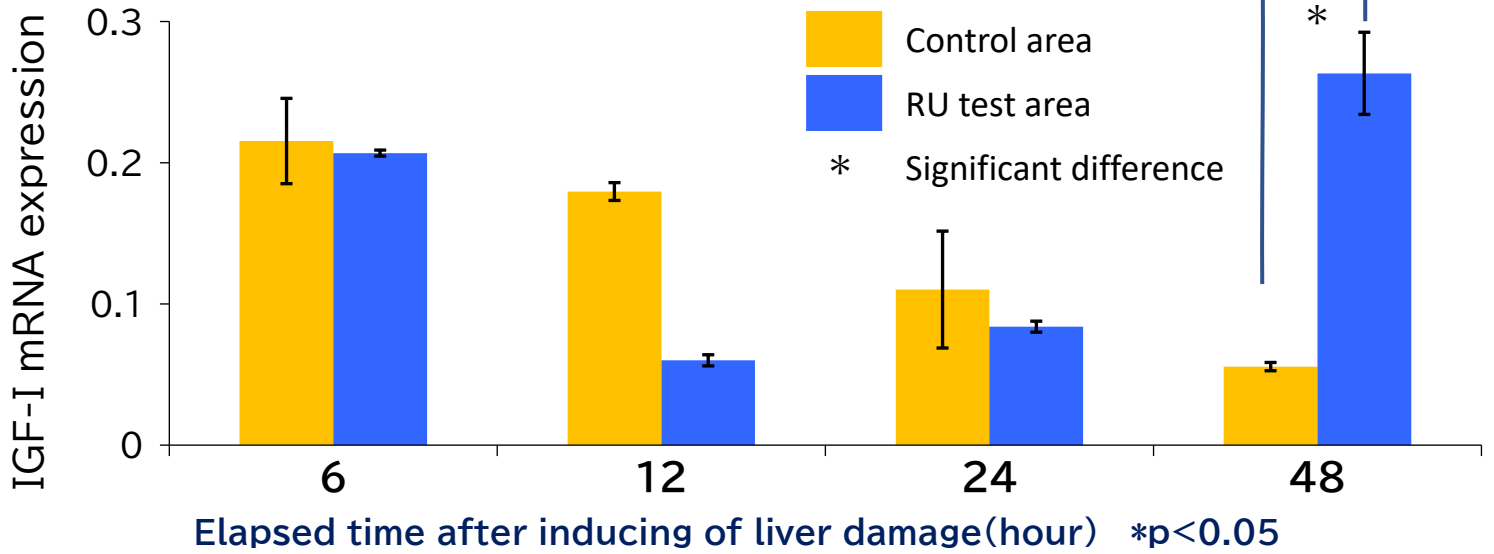




# ~Evaluation of restraint for hepatopathy by rat~

## Result : IGF-1 gene expression

After inducing of liver damage, IGF-1 gene expression of test are was significantly increased after 48 hours.



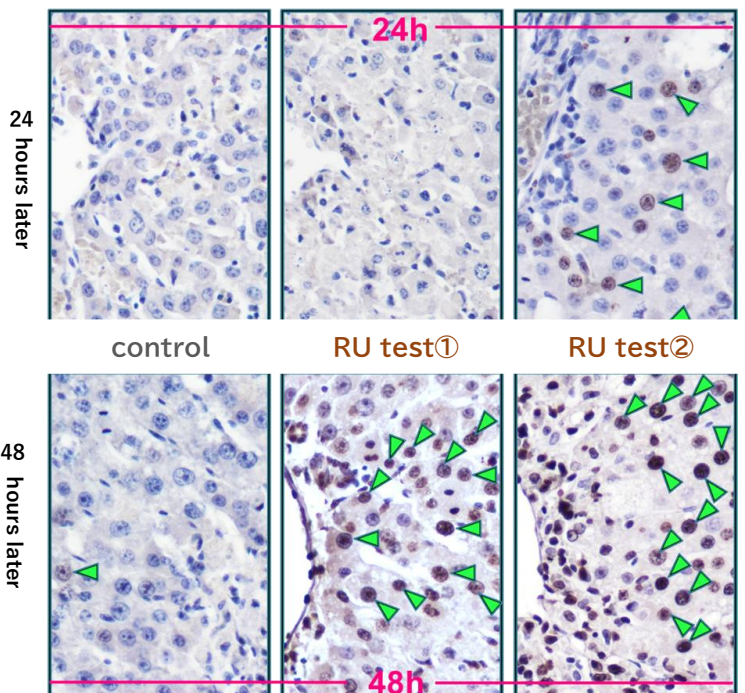
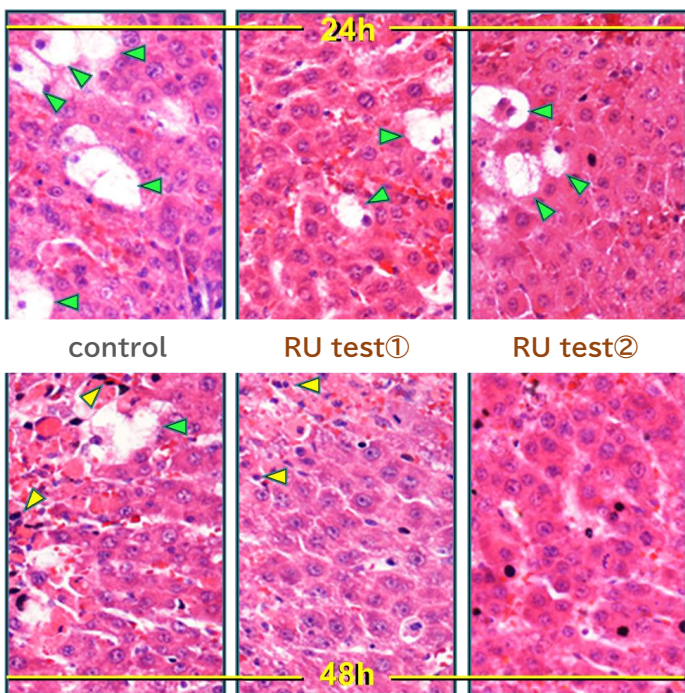
## Result : condition of liver cell

Comparison of liver cell after the indication is as follows. White part pointed by green triangle shows fat denatured cell by necrosis.

The denaturation was lost in both of test after 48 hours.

Green triangle indicates stained substance used for cell division. The substance was confirmed in test area ② 24 hours later and both of test areas 48 hours later.

We are sure test areas' cell carried out cell division faster than control area, and it encourage recovery of the cell.





# ~ Evaluation of restraint of liver damage by Holstein ~

(2005 Azabu university)

Preliminary test: evaluation in late non-lacting period by feeding RU product.

## Test method and result

Holstein were fed 10g of HEPA-AID® (containing 10% of RU) at four diary farms.



Number of days open was reduced at all farms. Average 57day±22day was reduced ( $p < 0.05$ )

## Number of days open

Farm	Before (day)	After (day)	Number of diary
A	153.7	→ 99.6	n=25
B	155.4	→ 106.8	n=27
C	173.8	→ 84.8	n=9
D	202.2	→ 164.7	n=135

Based on above result, following test was carried out.

## Effect of feeding aqueous extract of Rhizopus oryzae on bovine blood IGF-1 levels and reproductive performance

(2013 Japanese Society of Veterinary Science)

### Test method

Test area (delivered Holstein) was fed 10g of HEPA-AID® (containing 10% of RU) for 20 days prior to delivery day, and measured IGF-1 and blood biochemistry test under the following condition respectively.

Test area n = 8  
HEPA-AID®  
10g/count/day

Top dress feeding  
(20 days prior to delivery day)

IGF-1: blood sampling & measuring weekly from delivered day

Before 20 days ... 1 week Delivered day After 1 week 2 weeks 3 weeks 4 weeks ... 8 weeks

Control area = 8

Blood biochemistry test :  
Measured one before week of delivered day, the day and even number weeks

Holstein (delivered)

### Result : reproductive performance and blood test

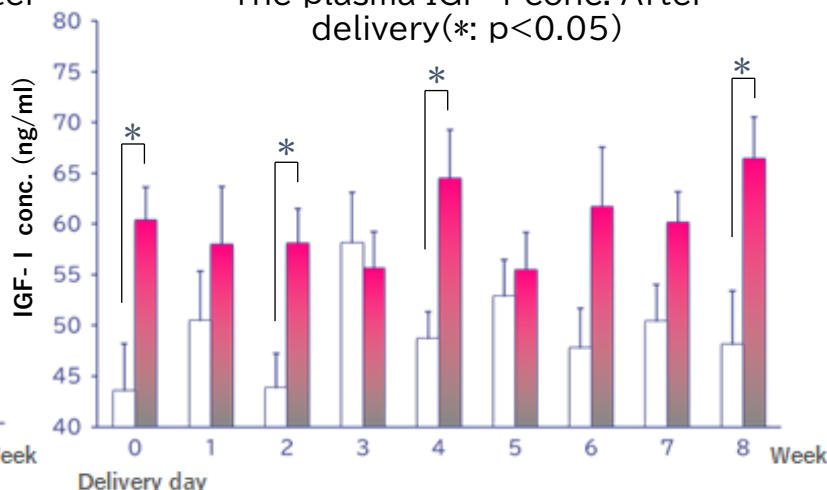
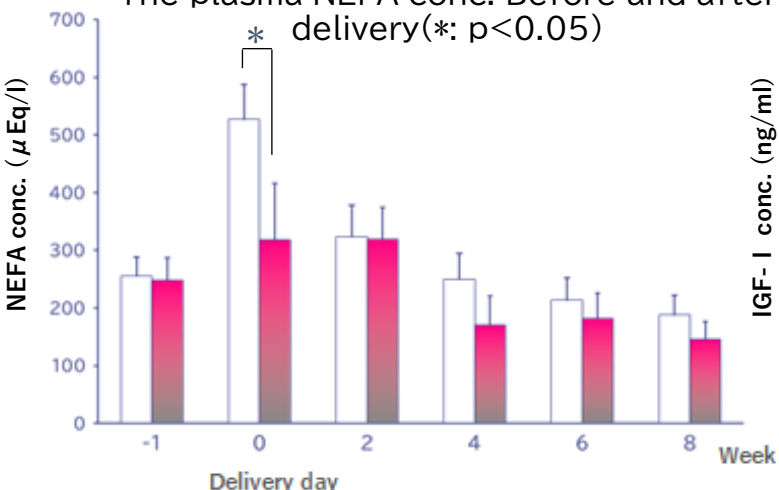
Test area fed RU product recorded significant result as shown on the right in points of a number of days from deliver to estrus and the conception rate.

	Test area (day)	Control area (day)
Number of days from delivery to initial heat	43.0±33.1 (n=6)	63.0±35.0 (n=5)
conception rate	66.7% (4/6)	40% (2/5)

The plasma NEFA conc. Before and after delivery was lower in test area. The plasma IGF-1 conc. After delivery was higher in test area. These superior results were confirmed in test area.

The plasma NEFA conc. Before and after delivery (\*:  $p < 0.05$ )

The plasma IGF-1 conc. After delivery (\*:  $p < 0.05$ )





# ~ Evaluation of restraint of liver damage by Holstein ~

## Effect of feeding *Rhizopus oryzae* aqueous extract on serum markers of liver injury and kinetics of function-related gene expression in liver tissue of dairy cows during the postpartum period.

(2020 The Journal of Farm Animal in Infectious Disease )

### Test method

Test area (delivered Holstein) was fed 10g of HEPA-AID® for 3 weeks prior to delivery day, and measured AST, ALT by blood biochemistry test under the following condition.

Test area n = 3  
HEPA-AID®  
10g/count/day

Feeding from 3 weeks prior to the delivery day to the day

3 weeks    2 weeks    Before 1 week    Delivered day    After 1 week    2 weeks    3 weeks

Control area = 3

Holstein

Blood biochemistry test :  
Measured from 3 weeks prior to delivered day to 3 weeks later weekly

### Result : enzymes in blood by blood biochemistry test

Test area fed RU product recorded lower value of these enzymes than those of control area. It was confirmed that these enzymes drained from liver was lower in test area.

